

**EINFLUSS EINER EXPERIMENTELLEN CHRONISCHEN
NIERENINSUFFIZIENZ AUF DIE BINDUNG BASISCHER
PHARMAKA AN PLASMA UND GEWEBE VON KANINCHEN**

WILHELM NOTHOFFER

1986

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Forth

Einfluß einer experimentellen chronischen Niereninsuffizienz
auf die Bindung basischer Pharmaka an Plasma und Gewebe von
Kaninchen.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nothofer Wilhelm
aus Schwabmünchen

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Kurz
Mitberichterstatter:		Prof. Dr. W. Forth
Dekan	:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.1986

Herrn Privatdozent Dr. Burkhard Fichtel danke ich für die Zuteilung des Themas und für die Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Besonderer Dank gilt Frau Ulrike Schwaiger für die geduldige und stets freundliche Betreuung bei unseren Versuchen und Laboruntersuchungen.

Wertvolle Anregungen erhielt ich von meinen Kollegen Dr. Gabi Schuhmann, Dr. Wolfgang Gerdemeier und Dr. Alexander von Nieceki. Besten Dank auch Herrn Wunsch für die gute Pflege unserer Versuchstiere.

Inhaltsverzeichnis

1.	Problemstellung	S. 1
2.	Methodik	S. 3
2.1	Operative Methoden	S. 3
2.2	Bestimmung des Kreatinin-, Harnstoff- und Proteingehaltes im Blutplasma	S. 8
2.3	Herstellung der Gewebekomogenate und Gewinnung des Plasmas	S. 8
2.4	Ultrafiltration	S. 10
2.5	Gleichgewichtsdialyse	S. 12
2.6	Substanzen und Nachweismethode	S. 13
2.7	Berechnung des gebundenen Pharmakonanteils	S. 16
2.7.1	im Gewebekomogenat	S. 16
2.7.2	im Plasmadialysat	S. 17
2.8	Statistische Methoden	S. 18
3.	Ergebnisse	S. 19
4.	Diskussion	S. 28
4.1	Kritik der Methode	S. 28
4.1.1	Chronische Niereninsuffizienz durch 5/6 Nephrektomie..	S. 28
4.1.2	Herstellung der Gewebekomogenate	S. 32
4.1.3	Ultrafiltration	S. 33
4.1.4	Dialyse	S. 34
4.2	Besprechung der Ergebnisse	S. 35

4.2.1	Bindung an Plasmaproteine bei chronischer Niereninsuffizienz	S. 35
4.2.2	Bindung an Gewebekomogenate	S. 40
4.2.2.1	Bindung an Muskelhomogenat	S. 40
4.2.2.2	Bindung an Leberhomogenat	S. 42
4.2.2.3	Bindung an Lungenhomogenat	S. 42
4.2.2.4	Bindung an Nierenhomogenat	S. 43
4.2.3	Vergleich der Plasma- und Gewebekbindung	S. 43
5.	Zusammenfassung	S. 47
6.	Literaturverzeichnis	S. 49

1. Problemstellung

Die pharmakologischen Wirkungen eines Arzneimittels sind abhängig von seinen pharmakokinetischen Eigenschaften, wie Aufnahme, Verteilung und Elimination. Neben Biotransformationsvorgängen und der Ausscheidung über andere Organe als der Niere, spielt dabei die unspezifische Bindung von Pharmaka an Plasma und Gewebe eine wesentliche Rolle.

Diese komplexen pharmakokinetischen Vorgänge unterliegen den verschiedensten Einflüssen und Störungen. So zeigen mehrere Studien der letzten Jahre, daß bei manchen Erkrankungen die Plasmabindung zum Teil erheblich verändert ist. Besonders ausgeprägt waren die Bindungsänderungen bei Patienten mit chronischen Leber- und Nierenerkrankungen (Kangas et al. 1976; Piafsky et al. 1978; Kober et al. 1979). An Patienten können jedoch nur die Änderungen bezüglich der Plasmabindung untersucht werden, nicht hingegen die Auswirkungen auf die Gewebefindung von Pharmaka. Um den Einfluß einer Niereninsuffizienz auf die Arzneimittelbindung genauer untersuchen zu können, bedarf es daher geeigneter Modelle. Während bereits mehrere Untersuchungen über die Bindung von Pharmaka bei Versuchstieren mit akuter Niereninsuffizienz veröffentlicht wurden (Taylor et al. 1954; Belpaire et al. 1977; Fichtl u. Kurz 1980b; Van Peer et al. 1981b), gibt es bisher kaum Literatur über Bindungsversuche bei Tieren mit chronischer Niereninsuffizienz. Ein Grund hierfür scheint zu sein, daß es noch kein überzeugendes Modell für eine experimentelle chronische Niereninsuffizienz gibt.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit der Erzeugung einer chronischen Niereninsuffizienz am Kaninchen und der Untersuchung der Bindungsänderungen im Plasma und Gewebe. Da die basischen Pharmaka in den oben angeführten Veröffentlichungen bei niereninsuffizienten Patienten die ausgeprägtesten Änderungen zeigten, wählten wir drei häufig verordnete basische Arzneimittel mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften (Tab. 2): Diazepam, Propranolol und Imipramin.

2. Methodik

2.1 Operative Methoden

Die Versuche zur experimentellen Erzeugung einer chronischen Nierensuffizienz wurden mit Kaninchen beiderlei Geschlechts von 2,5 bis 3,5 kg Körpergewicht durchgeführt. Als Methode wurde die 5/6 Nephrektomie gewählt (Abb. 1a, b).

Narkose

Zur Vorbereitung wurde den Versuchstieren ein Venenkatheter in eine Vene des zuvor hyperämisierten¹⁾ Ohres gelegt. Nach Entnahme von 5 ml Blut zur Kreatinin- und Harnstoffbestimmung, wurde an den Katheter eine Infusion mit isotoner NaCl-Lösung (Infusionsgeschwindigkeit ca. 0,5 ml/min) angeschlossen. Dadurch sollte eine Thrombosierung der Vene bzw. des Katheters während der Narkose verhindert werden.

Für die Narkose selbst wählten wir eine "Kombination" aus Neuroleptanalgesie und einem intravenös injizierbarem Kurznarkotikum. Dabei wurde die Sedation und Analgesie durch das Neuroleptikum Droperidol²⁾ und das Analgetikum Fentanyl²⁾ hervorgerufen. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde in unserem Fall durch das zusätzlich verabreichte Ketamin (Ketanest^R) herbeigeführt. Vorteil die-

1) mit Toluol-Äthanol-Gemisch 1 : 1

2) im Kombinationspräparat Thalamonal^R enthalten

Tabelle 1: Zeitplan und Dosierung der für die Anästhesie angewandten Medikamente

NARKOSE - PLAN

<u>Vorbereitung:</u>	Thalamonal ^R	0,2 ml/kg KG ¹⁾	i.v.
	Ketanest ^R	15 mg/kg KG	i.v.
<u>Einleitung:</u>	Ketanest ^R	7 mg/kg KG	i.v.
(zum Hautschnitt)			
<u>Erhaltungsnarkose:</u>			
0 - 30 min	Ketanest ^R	3 mg/kg KG alle 5 min	
	Thalamonal ^H	0,2 ml/kg KG alle 20 min	
nach 30 min	Ketanest ^R	3 mg/kg KG alle 8 min	
	Thalamonal ^R	0,2 ml/kg KG alle 25 min	
<u>Gesamtdosierung für die Dauer des Eingriffs:</u>			
nicht mehr als	Ketanest ^R	60 mg/kg KG	
	Thalamonal ^R	1,2 ml/kg KG	

1) KG = Körpergewicht

ser Narkosemethode ist der Erhalt der Spontanatmung, die gute Steuerbarkeit und die geringen Nebenwirkungen auf Herz, Kreislauf und andere Organe. Der zeitliche Ablauf und die Dosierung der Narkotika sind im Narkoseplan angegeben (Tab. 1).

5/6 Nephrektomie

Der Eingriff wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Operationsfeld wurde enthaart, mit gefärbter Merfen^R - Tinktur desinfiziert und mit sterilen Tüchern abgegrenzt. Beim operativen Vorgehen zu den beiden Nierenlagern wählten wir den transabdominalen Zugang über den oberen Medianschnitt - vom Processus xiphoideus des Brustbeins bis zum Nabel. Nach dem Hautschnitt erfolgte die Präparation und Durchtrennung der Linea alba mit Eröffnung des Abdomens. Durch Herausverlegen des Dünn- und Dickdarms aus der Bauchhöhle konnten die retroperitoneal gelegenen Nieren dargestellt werden. Das Austrocknen und Abkühlen der extraabdominal gelegenen Darmschlingen wurde durch Abdecken mit befeuchteten Tüchern¹⁾ und durch die Wärmestrahlung der Operationslampe verhindert. Anschließend wurde die rechte Niere freipräpariert und an ihren Gefäßen abgeklemmt. In der dadurch erzielten Blutleere wurde die bindegewebige Nierenkapsel im Bereich der Pole eröffnet und vom darunterliegenden Parenchym stumpf abgetrennt.

1) 0,9 % NaCl-Lösung, 37° C

Unter Schonung des Nierenbeckens wurden nun von beiden Polen jeweils ein ca. 2 - 3 g schweres, halbmondförmiges Stück Parenchym reseziert (Abb. 1a, b). Nach Adaption der beiden Schnittflächen wurde die Kapsel durch Einzelknopfnähte mit resorbierbaren Nahtmaterial²⁾ wieder verschlossen. Nach Öffnung der Gefäßklemmen und Stillung eventueller Nachblutung durch Auftropfen einer Thrombinlösung³⁾ konnte die Restniere wieder in situ gebracht werden. Die Darstellung der linken Niere erfolgte auf die gleiche Weise, sie wurde jedoch nach Unterbindung der Gefäße und des Ureters mit Kunstseide in toto entnommen.

Die Nebennieren mit ihren Gefäßen blieben bei diesen Eingriffen verschont. Nach der Rückverlegung der Darmschlingen in die Bauchhöhle wurde die Wunde schichtweise verschlossen.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurden die beiden Nieren nach ihrer Freilegung für je 8 - 10 min von ihrer Gefäßversorgung abgeklemmt. Dies entspricht etwa der Ischämiezeit der Niere bei der 5/6 Nephrektomie. Nierengewebe wurde bei diesen Operationen nicht entnommen.

2) Catgut Nr. 00

3) Topostasin^R

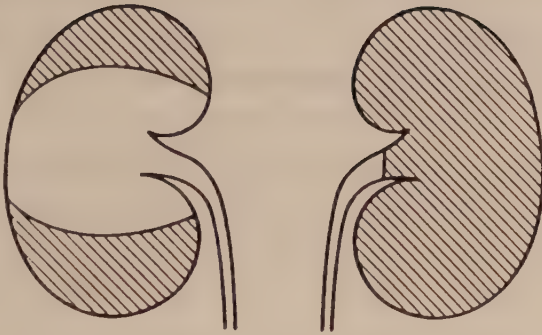


Abb. 1a: Schematische Darstellung der 5/6-Nephrektomie
(modifiziert nach ORMROD 1980).

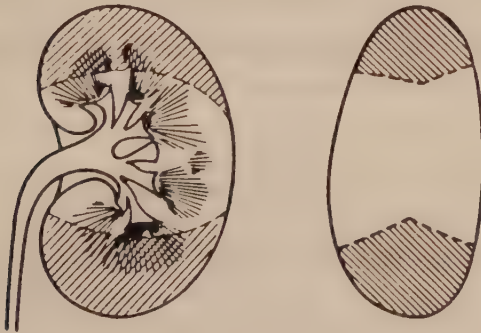


Abb. 1b: Schematischer Längsschnitt und Lateralansicht einer
Niere mit eingezeichneter operativer Schnittführung
(---) und resezierten Parenchymanteilen.

2.2 Bestimmung des Kreatinin-, Harnstoff- und Proteingehaltes im

Blutplasma

Um die Entwicklung der Niereninsuffizienz zu beobachten, wurde bei allen behandelten Versuchstieren präoperativ und am 1., 3., 5., 10. Tag nach der Operation sowie anschließend etwa alle 20 Tage 5 ml Blut aus einer Ohrvene entnommen und im Plasma die Kreatinin- und Harnstoffkonzentration bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde am Tag vor, 3 Tage nach und nochmals rund 6 Monate nach dem operativen Eingriff bestimmt.

Methoden¹⁾

Kreatinin	Pikrinsäure - Farbstoffreaktion nach JAFFE Messung bei 520 nm
Harnstoff	BERTHELOT - Reaktion (Merckotest ^R) Messung bei 546 nm
Protein	BIURET - Methode Messung bei 546 nm

2.3 Herstellung der Gewebehomogenate und Gewinnung des Plasmas

Etwa 240 (235 - 244) Tage nach der Operation wurden die Kaninchen durch Genickschlag getötet und ausgeblutet. Das Blut wurde in Glas-

1) aus E. Merck, Klinisches Labor, 11. Auflage

Darmstadt 1970 (Firmenschrift)

gefäßen gesammelt, welche ca. 0,5 ml Thrombophob^R-Lösung (ca. 2.500 E Heparin - Natrium) enthielten. Nach dem Zentrifugieren des Blutes (4 min; ca. 100 g) wurde das Plasma abpipetiert und bei -25° C tiefgefroren.

Für die Bindungsversuche an Muskelgewebe verwendeten wir möglichst faszien- und sehnearme Muskelgruppen. Hierfür eigneten sich besonders die Rücken- und Hinterbeinmuskulatur. Um ein weitgehend "reines" Homogenat zu erhalten, wurde nach Entnahme des Muskels das anhaftende Fett- und Bindegewebe abgelöst.

Die Leber wurde von ihren Gefäßen abgetrennt und als Ganzes entnommen. Anhängendes Fettgewebe sowie die Gallenblase wurden abpräpariert, ohne sie jedoch dabei zu eröffnen.

Als Vorbereitung für die Homogenatherstellung wurde bei den Nieren die bindegewebige Kapsel stumpf vom Parenchym gelöst. Zur Präparation der Lunge trennten wir Bronchien und Lungengefäße hilusnah ab und entfernten das in den großen Gefäßen verbliebene Blut durch leichtes Komprimieren. Bis zur weiteren Verwendung wurden auch die Gewebestücke bei -25° C tiefgefroren.

Herstellung von Gewebhomogenaten

Hierzu wurden die aufgetauten Gewebestücke zunächst durch Betupfen mit Fließpapier von anhaftender Flüssigkeit befreit und anschließend im Fleischwolf zerkleinert. Für einen Versuchsan-satz wurden 100 - 120 g entnommen, mit der 0,8 fachen Menge 0,05 mol/l Phosphatpuffer pH 7,0 verdünnt und daraufhin homogeni-

siert¹⁾. Um dabei eine übermäßige Erwärmung des Muskelbreies zu vermeiden, wurde der Brei durch eine Eis/Wasser-Mischung gekühlt und die Gesamtzeit des Homogenisierens auf mehrere kurze Intervalle mit dazwischenliegenden Abkühlpausen verteilt. Die Wasserstoffionenkonzentration der Homogenate bestimmten wir mittels eines pH-Meters²⁾. Diese lag für Muskel im Durchschnitt bei pH 6,2; für Leber bei pH 6,75; für Lunge bei pH 6,85 und für Nierenhomogenat bei pH 6,65. Da das Ausmaß der Gewebefixierung von Pharmaka vom pH-Wert des Homogenates abhängig ist (Kurz u. Fichtl 1980), wurde die Wasserstoffionenkonzentration mit einer 2 mol/l Na_2CO_3 -Lösung auf einen einheitlichen Wert von pH 7,0 eingestellt. Dieser pH-Wert entspricht in etwa dem physiologischen pH-Milieu im Gewebe.

Zur Ermittlung des Wassergehaltes der Gewebehomogenate wurden pro Versuchsansatz je 3 Proben bei 105° C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2.4 Ultrafiltration

Die Bestimmung des nicht gebundenen Anteils der Substanzen im Gewebehomogenat erfolgte durch Ultrafiltration. Hierzu wurden "Visking" - Dialysierschläuche³⁾ für 30 min in entmineralisiertes Wasser gelegt, wodurch das Herauslösen des Imprägniermittels bewirkt wurde. Dieser

1) "Tornado", Fa. Emmendinger Maschinenbau

2) Digital-pH-Meter 646, Fa. Knick

3) Typ 20/32; Serva-Feinbiochemica, Heidelberg

Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die durch Verknoten und Aufblasen der gewässerten Schläuche gebildeten Säckchen wurden bis zur weiteren Verwendung in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Mittels Pipette oder einer großvolumigen (50 ml) Injektionsspritze wurden dann in diese Säckchen 10 ml Puffer-Substanz-Gemisch (vgl. Tab. 3) bzw. 10 mg Homogenat-Substanz-Gemenge (vgl. Tab. 3) abgefüllt und mit einem Doppelknoten verschlossen. Anschließend wurden sie in Edelstahl-Siebeinsätze gelegt, diese wiederum in entsprechende Zentrifugengläser gegeben und das Ganze mit einer Parafilmfolie abgedeckt (Abb. 2). In einer gekühlten Zentrifuge ($2 - 4^{\circ}\text{C}$) wurde dann bei 270 g etwa 1 ml Flüssigkeit abfiltriert. Dabei war für das Puffer-Substanz-Gemisch eine Zentrifugenlaufzeit von ca. 4 Std., für das Homogenat-Substanz-Gemenge von ca. 8 Std. erforderlich.

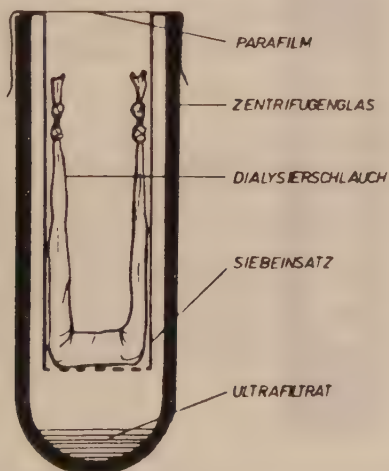


Abb. 2: Schema der Vorrichtung zur Ultrafiltration

2.5 Gleichgewichtsdialyse

Die Bindung der Pharmaka an Plasmaproteine wurde mittels Gleichgewichtsdialyse bestimmt. Dazu wurden Dialysezellen¹⁾ aus Edelstahl benützt, deren Kammer durch eine semipermeable Membran²⁾ in zwei Hälften aufgeteilt wird (Abb. 3). In eine Kammerhälfte (proteinhaltige Phase) wurden 2 ml Blutplasma, in die andere (proteinfreie Phase) 2 ml radioaktiv markiertes (^3H bzw. ^{14}C) Puffer-Substanz-Gemisch (vgl. Tab. 3) gegeben. Die Verwendung von zwei im pH-Wert verschiedenen Puffer für Gewebe und Plasma, geschah auf Grund des unterschiedlichen pH-Milieus im Intra- bzw. Extrazellulärraum in vivo. Die Dialyse wurde über ca. 16 Std. bei einer Temperatur von rund 4°C im Kühlraum durchgeführt.

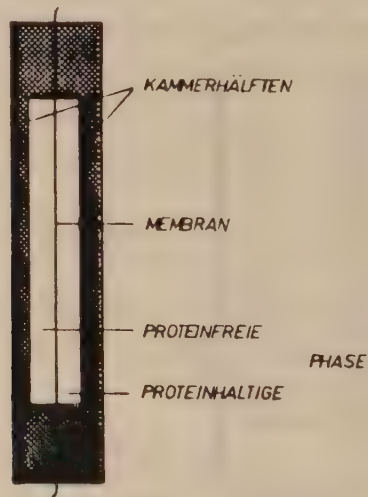


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Dialysezelle

1) Dianorm^R-Dialysegerät

2) Dialysemembran Diachema^R (Porenweite 15×10^{-7} mm)
Fa. Bachofer, Reutlingen

2.6 Substanzen und Nachweismethode

Die drei basischen Pharmaka, die auf ihre Bindung an Plasma bzw. Gewebe bei chronischer Niereninsuffizienz untersucht wurden, und einige physikalisch-chemischen Daten sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Pharmakon	Abk.	pKa ^{a)}	% diss. bei pH 7,0	V _k Okt./Pu ^{b)} bei pH 7,0
Diazepam	DIZ	3,31	0,02	720
Propranolol	PRO	9,24	99,7	14
Imipramin	IMI	9,5	99,7	123

Tab. 2: Physikalisch-chemische Daten der Pharmaka, die bei Bindungsversuchen verwendet wurden.

V_k Okt./Pu: Lipid/Wasser - Verteilungskoeffizient zwischen Oktanol und Puffer.

Von obigen Pharmaka wurde zunächst die Ausgangslösung mit einer Substanzkonzentration von ca. 10^{-4} mol/l hergestellt (Tab. 3). Hierzu wurden $5 \cdot 10^{-3}$ Mol Substanz in 50 ml aqua dest. gelöst und mit Phosphatpuffer pH 7,0 für Gewebe bzw. pH 7,4 für Plasma auf 1 : 10 verdünnt. Die weiteren Verdünnungsschritte bis zu einer Substanzkonzentration im Homogenat bzw. Plasma von ca. 10^{-5} mol/l sind für Gewebe und Plasma unterschiedlich (vgl. Tab. 3).

a) Herzfeldt, C.D. (1980)

b) v. Nieciecki, A. (1983)

Tab. 3: Verdünnungsreihe für die Versuchsansätze

Ausgangslösung:

5 - 10^{-3} Mol Substanz in 50 ml aqua dest. lösen

- davon 1 ml + 9 ml isotoner Phosphatpuffer pH 7,0 (Gewebe)

bzw. pH 7,4 (Plasma)

Ansatz für Gleichgewichtsdialyse:

2 ml Ausgangslsg. + 20 μ l radioaktiv markierte Pharmakonlsg.⁺⁾

+ 18 ml Phosphatpuffer pH 7,4

ergibt ca. 20 ml Puffer-Substanz-Gemisch⁺⁾

proteinfreie Phase

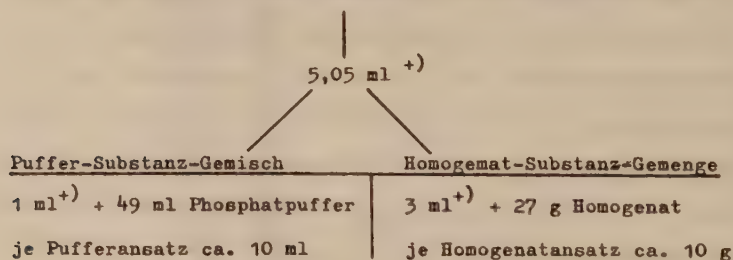
proteinhaltige Phase

2 ml Puffer-Substanz-Gemisch⁺⁾

2 ml Plasma

Ansatz für Ultrafiltration:

5 ml Ausgangslsg. + 50 μ l radioaktiv markierte Pharmakonlsg.⁺⁾



Im vorliegenden Ansatz ist der Verdünnungsfaktor q des Puffer-Substanz-Gemisches im Vergleich zum Homogenat-Substanz-Gemenge

⁺⁾ radioaktiv markiert

gleich 5. Die Endkonzentration des Pharmakons im Homogenat beträgt ca. 10^{-5} mol/l.

Für den Nachweis der Pharmaka im Ultrafiltrat bzw. Dialysat wurde der Ausgangslösung radioaktiv markiertes Pharmakon (vgl. Tab. 3 und 4) zugesetzt. Die Menge an markierter Substanz wurde so gewählt, daß nach Dialyse bzw. Ultrafiltration eine Zählrate von mindestens 1.000 cpm pro Probe zu erwarten war. Für jedes Pharmakon wurden pro Versuch drei Ansätze durchgeführt.

Pharmakon	Isotop	spezifische Aktivität (Ci/mmol)	radiochem. Reinheit (%)	molekulare Masse
Diazepam ¹⁾	^{14}C	0,057	99	287
Propranolol ¹⁾	^3H	22,0	98	296
Imipramin ¹⁾	^3H	23,0	95	281

Tab. 4: Radioaktiv markierte Pharmakonlösungen, die für Bindungsuntersuchen verwendet wurden (Herstellerangaben).

Die Berechnung der Pharmakonbindung erfolgte über die Bestimmung der Aktivität der Proben im Szintillationszähler²⁾. Zu diesem Zweck wurden vom Ultrafiltrat jeweils 200 μl , vom Dialysat jeweils 100 μl entnommen und in 15 ml Bray's Szintillationslösung gegeben.

1) bezogen über Fa. Amersham Buchler, Braunschweig

2) PACKARD Szintillationszähler TRI CARB Mod. 3255

2.7 Berechnung des gebundenen Pharmakonanteils

2.7.1 im Gewebehomogenat

Für die Bestimmung der Gewebefindung waren folgende Ansätze notwendig

Ansatz	Zählrate N	Konzentration im Ultrafiltrat
1. 10 ml Puffer <u>ohne</u> radioaktiv markierte Substanz (= Blindwert)	N_P^0	
2. 10 ml Puffer <u>mit</u> radioaktiv markierter Substanz	N_P	C_P
3. 10 g Gewebehomogenat <u>ohne</u> radioaktiv markierte Substanz (Blindwert)	N_H^0	
4. 10 g Gewebehomogenat <u>mit</u> radioaktiv markierter Substanz	N_H	C_H

Der Flüssigkeitsgehalt im Gewebehomogenat läßt sich anhand des Trockengewichtes T (%), das aus getrockneten Homogenatproben ermittelt worden war, bestimmen:

$$F = 1 - \frac{T}{100}; \quad (1)$$

Für die Gesamtmenge der Substanz im Ansatz gilt:

$$\text{- davon sind nicht gebunden: } S_{\text{ges.}} = C_P \times 10; \quad (2)$$

$$S_{\text{ungeb.}} = C_H \times 10 \times F; \quad (3)$$

Aus (2) und (3) ergeben sich für den nicht gebundenen bzw. gebundenen Anteil der Substanzen:

$$\text{ungeb. (\%)} = 100 \times \frac{C_H \times F}{C_P}; \quad (4)$$

$$\text{gebund. (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{C_H \times F}{C_P} \right); \quad (5)$$

Unter der Annahme, daß im Ultrafiltrat zwischen der Pharmakonzentration und der im Szintillationszähler ermittelten Zählrate N eine lineare Beziehung besteht und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors q (vgl. Tab. 3), sowie für (1) in (5) gilt:

$$\text{Bindung (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{1}{q} \times \frac{N_H - N_H^0}{N_P - N_P^0} \times \left(1 - \frac{T}{100}\right)\right)$$

2.7.2 im Plasmadialysat

Nach der Einstellung des Gleichgewichtes und unter der Voraussetzung gleicher Volumina (hier: 2 ml) auf beiden Seiten der Membran ergibt die Summe aus der Pharmakonzentration auf der proteinfreien (C_{pf}) und der proteinhaltigen (C_{ph}) Seite die Gesamtkonzentration, die zu Beginn der Dialyse eingesetzt wurde. Die ungebundene Substanz entspricht der Konzentration in der proteinfreien Phase (C_{pf}). Der gebundene Anteil C_b verbleibt im proteinhaltigen Anteil. Für ihn gilt:

$$C_b = C_{ph} - C_{pf}$$

Der gebundene Anteil des Pharmakons in Prozent wird dann nach folgender Gleichung berechnet:

$$\% \text{ geb.} = \frac{C_{ph} - C_{pf}}{C_{ph}} \times 100$$

Unter der Annahme, daß zwischen der Pharmakonzentration und der im Szintillationszähler ermittelten Zählrate N eine lineare Bezie-

hung besteht, kann der gebundene Anteil mittels der Zählraten errechnet werden:

$$\% \text{ geb.} = \frac{N_{ph} - N_{pf}}{N_{ph}} \times 100$$

2.8 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung dienten folgende Verfahren (Sachs 1978): Vergleiche von Mittelwerten wurden mittels des Mann-Wilcoxon-Testes (U-Test) durchgeführt. Die Beurteilung des Zusammenhanges zweier Größen erfolgte über die Berechnung des Spearmann'schen Rangkorrelationskoeffizienten. Zur Darstellung eines linearen Zusammenhanges zweier Größen wurde die Regressionsgerade und der Paerson-Bravais'sch Korrelationskoeffizient ermittelt.

Die Berechnungen erfolgten anhand in BASIC geschriebener Programme auf einem Kleincomputer¹⁾.

Die Programme waren an Beispielen aus der Monographie von Sachs (1978) überprüft.

1) Olivetti P 6060

3. Ergebnisse

Chronische Niereninsuffizienz nach 5/6 Nephrektomie

Abb. 4 und 5 zeigen den Verlauf der Kreatinin- und Harnstoffwerte der 5/6 nephrektomierten im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren. In den ersten Tagen nach 5/6 Nephrektomie zeigten die Versuchstiere einen ausgeprägten Anstieg der Kreatinin- und Harnstoffwerte. Im Verlauf des 10. - 20. Tages nach dem Eingriff sanken die Werte bis nahe an den Normbereich. Danach entwickelte sich eine chronische Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention mit langsamen Anstieg der harnpflichtigen Substanzen. Im Verlauf von rund 240 Tagen erreichten die nephrektomierten Versuchstiere gegenüber der Kontrollgruppe einen um etwa 100 % höheren Kreatinin- und Harnstoffspiegel im Plasma. Die Kaninchen wurden rund 240 Tage nach dem operativen Eingriff getötet. Dabei war die Proteinkonzentration im Plasma der niereninsuffizienten Tiere ($5,8 \pm 0,5 \text{ g \%}$) nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe ($5,6 \pm 0,4 \text{ g \%}$).

Ergebnisse der Bindungsversuche

In Abb. 6 sind die Plasmabindungswerte der 3 basischen Pharmaka graphisch durch den ungebundenen Anteil dargestellt. Bei einigen Tieren war im Verlauf der Monate nach 5/6 Nephrektomie ($n = 3$) bzw. Kontrolloperation ($n = 2$) eine drastische Gewichtsabnahme zu beobachten (bis zu 40 % des Körpergewichts innerhalb von 4 Wochen). Wir vermuteten bei diesen Tieren eine chronische Entzündung als Begleiterkrankung und faßten daher die Bindungswerte dieser Kaninchen in Abb. 6 in

eigenen Gruppen zusammen. Dabei fiel auf, daß die Bindung von Propranolol und Imipramin signifikant höher war, als bei den Tieren ohne entzündliche Begleiterkrankung. Die Plasmabindung von Diazepam war hingegen nicht verändert.

Tab. 5 gibt die Werte für die Bindung der Pharmaka an Kaninchenplasma wieder. Dabei waren die Bindungsänderungen in der niereninsuffizienten Gruppe nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der scheinoperierten Tiergruppe.

Die Bindungswerte der 3 basischen Substanzen an Gewebhomogenate sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Es fanden sich insgesamt nur geringe Bindungsänderungen bei den niereninsuffizienten Kaninchen im Vergleich zu den Tieren aus der Kontrollgruppe. Im Muskelhomogenat wurde Imipramin bei chronischer Niereninsuffizienz vermehrt gebunden. Die beiden übrigen Substanzen zeigten keine signifikante Änderung der Muskelbindung.

Im Leberhomogenat wurde Diazepam bei urämischen Kaninchen vermindert gebunden.

Die Bindung der untersuchten Pharmaka an Lungen- und Nierenhomogenat war nicht verändert.

In Abb. 7 und 8 sind die Bindungswerte der 3 basischen Substanzen an Muskel- und Leberhomogenat graphisch dargestellt. Wegen des niedrigen Organgewichtes der Leber (rund 75 g), Lunge (15 g) und Niere (15 g) wurden für einen Versuchsansatz mehrere Organe von verschiedenen Tieren zusammengefaßt. Aus diesem Grund konnten für die Bindung an Homogenat von oben genannten Organen nur fünf (Leber) bzw. drei (Lunge und Niere) Werte bestimmt werden.

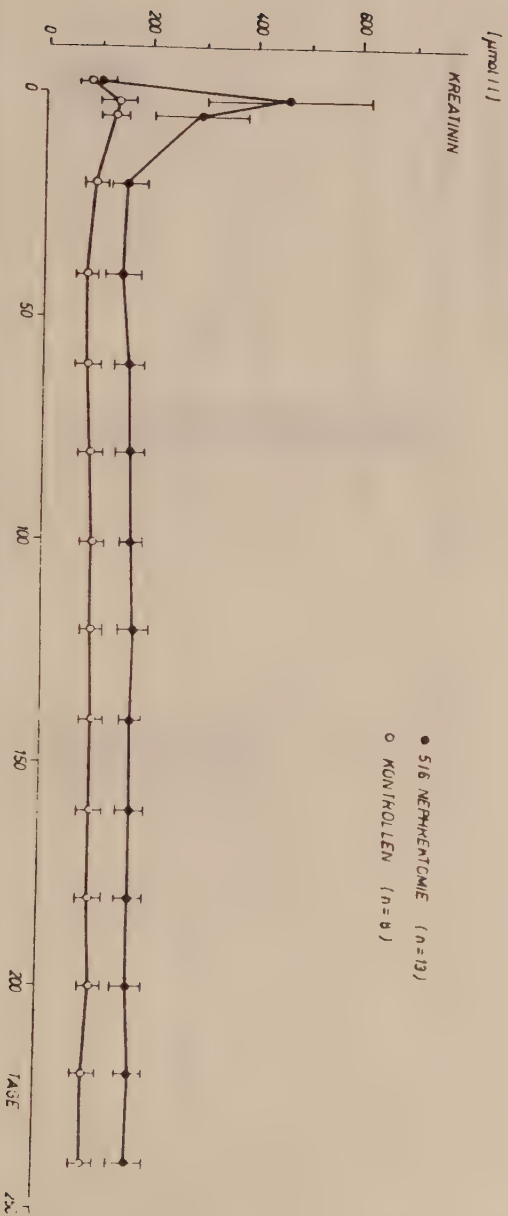


Abb. 4: Verlauf des Kreatininspiegels im Plasma der 5/6 nephrektomierten bzw. scheinoperierten Kaninchen.

Die Operation erfolgte am Tag 0.

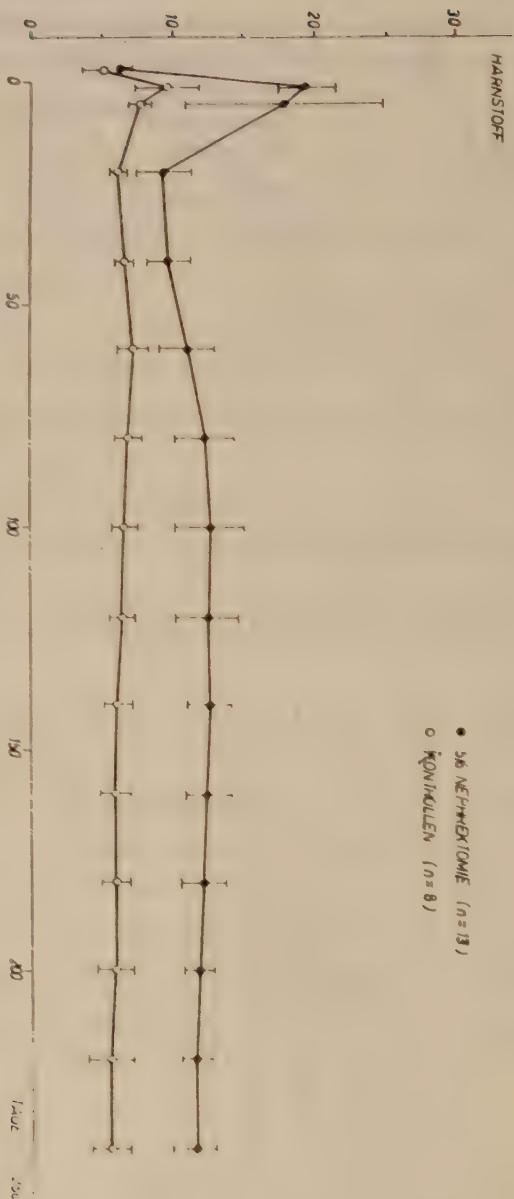


Abb. 5: Verlauf des Harnstoffspiegels im Plasma der 5/6 nephrektomierten bzw. schneid-
operierten Kaninchen.

Die Operation erfolgte am Tag 0.

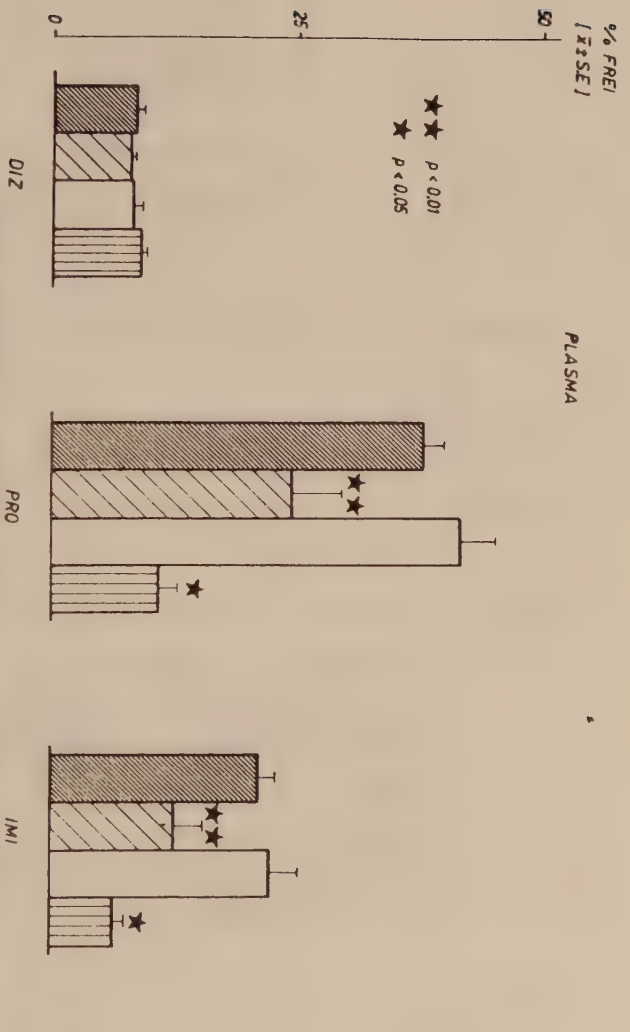


Abb. 6:

Bindung basischer Substanzen an Blutplasma von 5/6 nephrektomierten (NI) ohne  (n=8) bzw. mit entzündliche Begleiterkrankung  (n=3) und scheinoperierten (KO) Tieren ohne  (n=6) bzw. mit Entzündung  (n=2), dargestellt durch den freien Anteil. Die Bestimmung der Bindungswerte erfolgte ca. 240 Tage nach der Operation.

DIZ = Diazepam; PRO = Propranolol; IMI = Imipramin;

$\bar{x}$ = Mittelwert; S.E. = Standardabweichung; n = Stichprobenumfang;

Plasma

Substanz	5/6 Nephrektomie (% gebunden) n = 11	Kontrollgruppe (% gebunden) n = 8
DIAZEPAM	91,5 $\pm$ 0,6 n. s.	91,8 $\pm$ 1,3
PROPRANOLOL	62,2 $\pm$ 2,1 n. s.	58,4 $\pm$ 3,9
IMIPRAMIN	78,7 $\pm$ 1,8 n. s.	77,8 $\pm$ 3,2

Tabelle 5: Bindung von 3 basischen Substanzen an Plasma nach Erzeugung einer chronischen Niereninsuffizienz durch 5/6 Nephrektomie. Die Bestimmung der Bindungswerte erfolgte ca. 240 Tage nach der Operation.

Angegeben sind die Mittelwerte der Bindung in Prozent mit den Standardabweichungen.

n. s. = nicht signifikant;

Gewebe

	Muskel		Leber		Niere		Lunge	
	5/6 Neph.	Kontrolle	5/6 Neph.	Kontrolle	5/6 Neph.	Kontrolle	5/6 Neph.	Kontrolle
	n = 11	n = 8	n = 5	n = 5	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
DIASEPAM	88,4 ± 1,5	89,1 ± 1,1	95,3 ± 0,5 ⁺⁺	96,4 ± 0,4	94,9 ± 0,3	94,1 ± 0,3	89,7 ± 1,1	89,6 ± 0,7
PROPRANOLOL	81,9 ± 1,4	81,5 ± 0,8	96,5 ± 0,4	96,3 ± 0,5	97,5 ± 0,3	96,0 ± 0,4	93,3 ± 0,4	94,3 ± 1,1
INDIPACIN	91,1 ± 1,2 ⁺⁺	89,5 ± 1,1	97,3 ± 0,5	97,4 ± 0,6	97,0 ± 0,2	97,3 ± 0,1	96,4 ± 0,1	96,5 ± 0,2

25
1

Tabelle 6: Bindung von 3 basischen Substanzen an Skelettmuskel, Leber, Niere und Lunge von Kaninchen nach Erzeugung einer chronischen Niereninsuffizienz durch 5/6 Nephrektomie. Die Dauer der Niereninsuffizienz betrug rund 240 Tage.

Angaben sind die Mittelwerte der Bindung in Prozent mit den Standardabweichungen.

++ Signifikanzniveau $p < 0,01$;

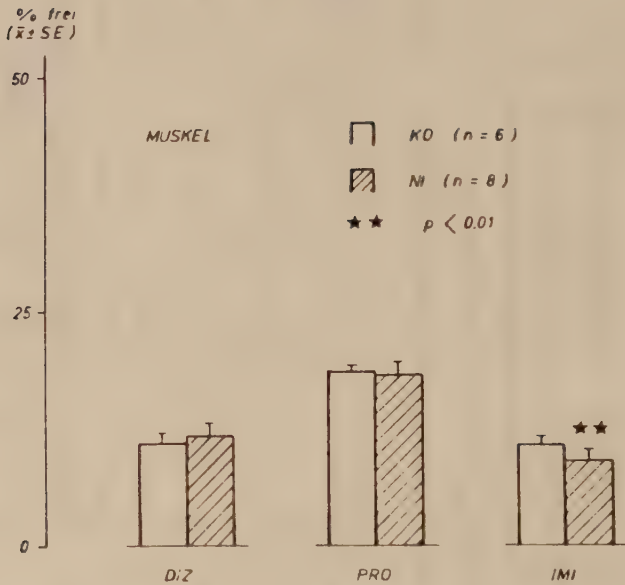


Abb. 7: Bindung basischer Substanzen an Muskelhomogenat von 5/6 nephrektomierten (NI) bzw. scheinoperierten (KO) Kaninchen, dargestellt durch den freien Anteil. Die Bestimmung der Bindungswerte erfolgte ca. 240 Tage nach der Operation.

DIZ = Diazepam; PRO = Propranolol; IMI = Imipramin;
 $\bar{x}$ = Mittelwert; S.E. = Standardabweichung;
p = Signifikanzniveau;

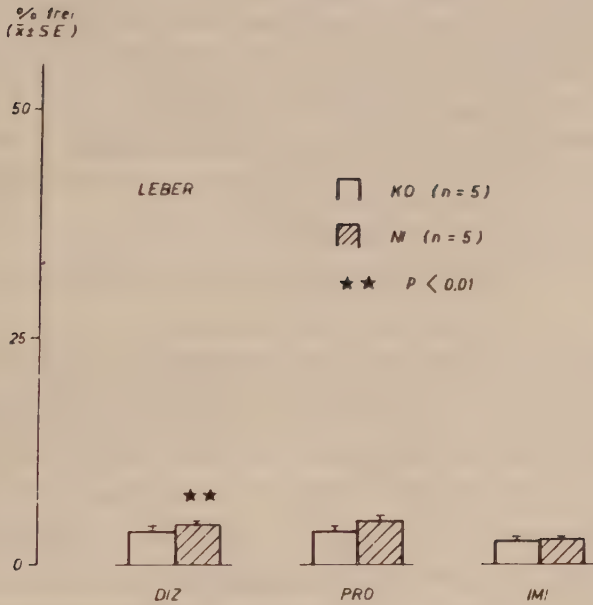


Abb. 6: Bindung basischer Substanzen an Leberhomogenat von 5/6 nephrektomierten (NI) bzw. scheinoperierten (KO) Kaninchen, dargestellt durch den freien Anteil. Die Bestimmung der Bindungswerte erfolgte ca. 240 Tage nach der Operation.

DIZ = Diazepam; PRO = Propranolol; IMI = Imipramin;

$\bar{x}$ = Mittelwert; S.E. = Standardabweichung;

p = Signifikanzniveau;

4. Diskussion

4.1 Kritik der Methode

4.1.1 Chronische Niereninsuffizienz durch 5/6 Nephrektomie

Zur experimentellen Erzeugung einer Niereninsuffizienz stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Die gebräuchlichsten sind:

- a) Subkutane Injektion von Glycerin
- b) Intravenöse Injektion von Uranyl nitrat
- c) Ligatur der beiden Ureter
- d) Partielle Nephrektomie
 - in einer Operationssitzung (Giacomini et al. 1981)
 - in zwei Operationssitzungen (Ormrod 1980)

Die unter a), b) und c) beschriebenen Methoden eignen sich aufgrund ihrer schlechten Steuerbarkeit - das Ausmaß des Parenchymverlustes ist nur schwer zu beurteilen - in erster Linie für die Erzeugung einer akuten Niereninsuffizienz. Als geeignetste Methode zur Erzeugung einer chronischen Niereninsuffizienz bot sich die 5/6 Nephrektomie an. Hierbei ist der Schweregrad der Niereninsuffizienz durch das Ausmaß der Parenchymentnahme steuerbar.

Aufgrund der Untersuchungen von Giacomini et al. (1981), der bei in einer Sitzung durchgeführten 5/6 Nephrektomie von einer geringeren Streuung der Ergebnisse im Vergleich zum Verfahren mit zwei Operationschritten berichtet und wegen des geringeren zeitlichen und materiellen Aufwandes führten auch wir die subtotalen Gewebeentnahme in einer Sitzung durch.

Da sich in der Niere das funktionelle Gewebe mit den Nephronen nahe-

zu ausschließlich in der Rinde befindet, kann das Parenchym bei der von uns angeführten Schnittführung (vgl. Abb. 1a, b) besonders effektiv reseziert werden.

Bei unseren Versuchstieren lag der Verlust an Gesamtnierengewebe bei durchschnittlich 65 % und damit der Anteil des Restnierengewebes bei 35 %. Nach Abzug der glomerulafreien Gewebemasse, wie Nierenmark und Nierenbeckengewebe, dürfte ein Restparenchymanteil von rund 20 % als durchaus realistisch angesehen werden. Der Verlust an funktionellem Nierengewebe würde damit bei ca. 80 % liegen.

Wie aus Abb. 4 und 5 zu ersehen ist, läßt sich die entstehende Niereninsuffizienz in eine etwa 5 Tage dauernde akute, unmittelbar postoperativ einsetzende Phase und in eine, ab etwa dem 30. postoperativen Tag beginnende, chronische Phase einteilen.

In die unmittelbar postoperative Phase fällt das Einsetzen der verschiedenen Kompensationsvorgänge zur Überwindung der Nierenfunktionseinschränkung (Rous and Wakin 1967; Toback et al. 1974). Dazu gehören die Erhöhung der Nierendurchblutung und der glomerulären Filtrationsrate, die Verminderung der Reabsorption im distalen Tubulus und die kompensatorische Größenzunahme durch Hypertrophie und Hyperplasie des restlichen Nierengewebes (Threlfall et al. 1967; Hayslett 1979). In welchem Ausmaß die einzelnen Adaptionsvorgänge wirksam sind, wird von den verschiedenen Untersuchern unterschiedlich beurteilt (Katz et al. 1967; Donadio et al. 1967; Pabico et al. 1975). Eine gewichtige Rolle kommt der Hypertrophie des Rest-

nierengewebes zu.

Studien an Ratten zeigten, daß das Ausmaß der Größenzunahme eng mit der Menge des operativ entfernten Nierenparenchyms korreliert.

Kaufmann et al. (1974) berichten bei Versuchen an Ratten von einem Zuwachs von 81 % bzw. 168 % nach Entnahme von 50 % bzw. 70 % Nierengewebe. Diese Zunahme beruht sowohl auf Hyperplasie als auch auf Hypertrophie des Restparenchyms (Threlfall et al. 1967). Wir konnten bei Resektion von rund 65 % Nierenmasse eine Gewichtszunahme der Restniere um etwa 100 % beobachten. Dies erklärt auch, die im Vergleich zum Ausmaß der Gewebeentnahme nur mäßige Einschränkung der Nierenfunktion.

Der Übergang zwischen der akuten und chronischen Phase der Niereninsuffizienz, zeitlich etwa zwischen der 2. und 5. postoperativen Woche (vgl. Abb. 4 u. 5) gelegen, zeigt nahezu Normalwerte für Kreatinin und Harnstoff. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß in dieser Phase die Kompensationsvorgänge vollständig entwickelt sind und so die Nierenfunktion vorübergehend voll aufrecht erhalten ist. Vermutlich infolge nachlassender Wirksamkeit dieser Mechanismen kommt es ab der 4. - 5. postoperativen Woche zu einem langsamen Anstieg der Kreatinin- und Harnstoffwerte und damit zum Übergang in die chronische Phase der Niereninsuffizienz. Die in deren Verlauf um rund das Doppelte gegenüber den Normalwerten erhöhten Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Plasma entsprechen einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate um mehr als 60 %. Im weiteren Verlauf zeigte die Niereninsuffizienz keine Progredienz

(nahezu unveränderte Kreatinin- und Harnstoffwerte im Plasma). Bezüglich der klinischen Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz entspricht dies dem Stadium der kompensierten Retention. Auch klinisch zeigten die Versuchstiere mit deutlich ausgeprägter Polyurie und Polydipsie die typischen Symptome einer kompensierten chronischen Niereninsuffizienz. Die experimentelle Niereninsuffizienz ist also durchaus vergleichbar mit einer chronischen Niereninsuffizienz beim Menschen wie sie z.B. nach Glomerulonephritiden auftreten kann. Der Ausprägungsgrad der durch 5/6 Nephrektomie erzeugten Niereninsuffizienz ist mit einem Kreatininwert von $180 \mu\text{mol/l}$ jedoch nur mäßig. Es war in unseren Versuchen nicht möglich eine stärker ausgeprägte, länger andauernde Niereninsuffizienz, wie sie z.B. bei dialysepflichtigen Patienten zu beobachten ist, bei Kaninchen zu entwickeln. Alle Versuche durch umfangreichere Nierengewebsentnahme eine schwere, chronisch verlaufende Niereninsuffizienz zu erzeugen, hatten keinen Erfolg, da die Tiere innerhalb weniger Tage nach der Operation starben. Bereits bei der von uns erzeugten mäßigen Nierenfunktionseinschränkung lag die 8-Monats-Überlebensrate nach 5/6 Nephrektomie nur bei rund 60 %.

Zusammenfassend ausgedrückt kann die durch 5/6 Nephrektomie erzeugte experimentelle Niereninsuffizienz als ein gutes Modell für eine mäßige, chronische Niereninsuffizienz gelten. Für ausgeprägtere Formen der chronischen Niereninsuffizienz steht noch kein geeignetes Modell zur Verfügung.

4.1.2 Herstellung der Gewebehomogenate

Inwieweit sich die durch Bindungsversuche an Homogenaten gewonnenen Ergebnisse auf in vivo Verhältnisse übertragen lassen, wird von verschiedenen Untersuchern unterschiedlich bewertet. Einige Studien berichten über eine nur qualitativ richtige Wiedergabe der Bindungsverhältnisse in vivo (Schanker u. Morrison 1965; Höllt u. Teschemacher 1975). Besteht z.B. in vivo im Verteilungsgleichgewicht eines Pharmakons ein ausgeprägter Konzentrationsunterschied zwischen extra- und intrazellulären Flüssigkeitsräumen, dann ist dieser bei Messungen in Homogenaten aufgehoben. Fichtl und Kurz (1980a) berichten über nur unwesentliche Veränderungen der Bindungseigenschaften durch Homogenisieren von Rattenzwerchfellen. Auch Lin et al. (1982a, b) fanden für Ethoxybenzamid eine gute Übereinstimmung zwischen der in vitro mit homogenisierten Gewebe gemessenen Bindung und der aufgrund der Verteilung in vivo berechneten Bindung. Schuhmann (1984) berichtet ebenfalls von guter Übereinstimmung der in vitro und in vivo Bindungswerte von Thiopental, Imipramin, Diazepam und Chinidin an Muskel-, Lungen- und Nierenhomogenat. Die Bindung von Imipramin und Propranolol an Leberhomogenat zeigte dagegen in vivo und in vitro deutliche Unterschiede. Die Bindungsversuche führten wir bei einer Homogenattemperatur von 4° C durch. Durch das Kühlen der Homogenate wurde der Beeinflussung der Pharmakonbindung durch den Gewebestoffwechsel (Autolyse des Gewebes und Biotransformation) entgegen gewirkt. Die Gewebebin-
dung eines Pharmakons kann durch dessen Ionisationsgrad beeinflusst wer-

den. Um den pH-Wert des Homogenates dem physiologischen intrazellulären pH-Wertes anzugleichen, wurden die Gewebekomogenate mit Phosphatpuffer pH 7,0 verdünnt und mittels Natriumcarbonat auf pH 7,0 eingestellt.

4.1.3 Ultrafiltration

In der vorliegenden Arbeit wurde die Pharmakonbindung an Gewebekomogenat mittels Ultrafiltration bestimmt. Als weitere Methoden boten sich die Gleichgewichtsdialyse, Ultrazentrifugation und Gelfiltration an. Bei den im Gewebekomogenaten üblichen hohen Proteinkonzentrationen gilt die Ultrafiltration als Methode der Wahl, da sie bei geringerem Zeitaufwand im Vergleich zur Dialyse die Bindungswerte ähnlich genau wiedergibt (Kurz et al. 1977). Folgende störende Einflüsse auf das Meßergebnis und limitierende Faktoren für die Anwendung der Ultrafiltration sind zu beachten:

- Adsorption und Membranladung
- Siebeffekt
- Zunahme der Eiweißkonzentration im Homogenat im Verlauf der Ultrafiltration
- Donnan-Effekt

Die oben angeführten Fehlermöglichkeiten und Grenzen der Ultrafiltration spielen in der von uns angewandten Versuchsanordnung und für die untersuchten Pharmaka keine wesentliche Rolle. So ist die Adsorption der Substanzen an die Schlauchmembran und der Einfluß der Membranladung auf die Ultrafiltration bei den hier ver-

wendeten "Visking"-Schläuche gering (Craig u. King 1966; Craig u. Ansevin 1963). Der Fehler, der durch den Siebeffekt entsteht, wird bei Substanzen mit einer molaren Masse von etwa 300 mit rund 2 % angegeben (Kurz et al. 1977) und liegt damit für die in dieser Arbeit untersuchten Pharmaka (vgl. Tab. 4) innerhalb der Meßfehler-toleranz.

Nach Kurz et al. (1977) ist der Fehler, der durch die Zunahme der Eiweißkonzentration im Homogenat im Verlauf der Ultrafiltration auftritt, unterhalb einer Filtrationsmenge von 20 % gering. In unseren Versuchen wurde die Zentrifugationszeit so gewählt, daß nur 10 % (max. 15 %) der Homogenatmenge abfiltriert wurden.

Der Einfluß des Donnan-Effekts auf die Bindungswerte ist wegen der hohen Gewebefindung der untersuchten Substanzen (vgl. Tab. 6) ebenfalls vernachlässigbar gering.

4.1.4 Dialyse

Die Gleichgewichtsdialyse gilt als die klassische Methode zur Bestimmung der Proteinbindung. Das Prinzip der Dialyse ist die Diffusion des nicht gebundenen Pharmakons aus dem Plasma (protein-haltige Phase) durch eine semipermeable Membran in die protein-freie Pufferlösung bis zum Konzentrationsgleichgewicht. Als Fehlermöglichkeiten kommen ähnlich wie bei der Ultrafiltration die Adsorption an die Dialysemembran, der Donnan-Effekt und die Behinderung der Passage von Pharmaka durch die Membran in Betracht. Eine weitere Fehlerquelle ist die Adsorption an die Kammerinnen-fläche der Dialysezelle. Vorversuche bestätigen, daß der Fehler

durch die Adsorption sehr gering ist, wobei er bei der Verwendung von Metallkammern nochmals deutlich niedriger ist, als bei Kunststoffkammern.

Durch das Prinzip der Dialyse kann es aufgrund der osmotischen Aktivität der Proteinmoleküle zu Volumenverschiebungen durch die Membran kommen. Bei der Dialyse von Plasma ist der Fehler wegen der niedrigen Proteinkonzentration vernachlässigbar klein.

4.2 Besprechung der Ergebnisse

4.2.1 Bindung an Plasmaproteine bei chronischer Niereninsuffizienz

Von den drei untersuchten basischen Substanzen wird Diazepam im Blutplasma vorwiegend an Albumin, Propranolol und Imipramin dagegen mehr an das saure α_1^1 -Glykoprotein (Orosomukoid) und an Lipoproteine gebunden. Das saure α_1 -Glykoprotein als bindendes Protein für basische Pharmaka wurde erstmals von Fremstad et al. (1976) beschrieben. Für Imipramin wiesen Borga et al. (1977) die Bindung an dieses Protein nach. Sager et al. (1979) bezeichneten das saure α_1 -Glykoprotein sogar als das wichtigste Bindungsprotein für Propranolol im menschlichen Serum. Bei einer Reihe von pathophysiologischen Belastungssituationen, wie z.B. bei entzündlichen und malignen Erkrankungen kommt es zu einem ausgeprägten Anstieg der Plasmakonzentration dieses Proteins (Piafsky 1980).

1) hier: $\alpha_1 = a_1$

Bereits bei früheren Untersuchungen beobachteten Piafsky et al. (1978) unter solchen Bedingungen eine Bindungszunahme von bestimmten basischen Pharmaka wie z.B. Imipramin, Propranolol und vermuteten daher eine Korrelation zwischen der Proteinbindung basischer Substanzen und dem Plasmaspiegel des sauren α_1 -Glykoproteins. Kein Anstieg des Bindungsausmaßes war hingegen bei einer Reihe von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne entzündliche Begleiterkrankung zu beobachten, obwohl die Plasmakonzentration des sauren α_1 -Glykoproteins deutlich erhöht war. Das unveränderte Bindungsausmaß bei chronischer Niereninsuffizienz ist nach Piafsky et al. (1978) die Folge eines dem erhöhten Glykoproteinspiegel entgegenwirkenden Mechanismus wie z.B. die Verdrängung aus der Proteinbindung durch die Anhäufung körpereigener Stoffwechselprodukte infolge verminderter renaler Elimination.

In unseren Versuchen an Kaninchenplasma kamen wir zu ähnlichen Ergebnissen. Im Plasma von chronisch niereninsuffizienten Kaninchen ohne Begleiterkrankung ergaben sich für die Bindung von Propranolol und Imipramin keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren. Deutliche Unterschiede ergaben sich hingegen in einer Gruppe von Versuchstieren (vgl. Abb. 6) mit zusätzlicher Begleiterkrankung. Wie bereits im Kapitel Ergebnisse (vgl. S. 19) angedeutet, kam es bei einigen Versuchstieren zu einer drastischen Gewichtsabnahme von bis zu 40 % des Körpergewichts innerhalb eines Monats. Als Ursache vermuteten wir wegen gleichzeitig auftretenden multiplen Abszessen im Operationsnarbenbereich und in

verschiedenen inneren Organen (z.B. Leber) eine generalisierte Entzündung. Im Vergleich zu Kaninchen ohne entzündliche Begleiterkrankung war im Plasma dieser Tiere die Bindung von Propranolol und Imipramin deutlich erhöht, während sie für Diazepam unverändert blieb (vgl. Abb. 6). Ähnliche Beobachtungen machten bereits verschiedene Untersucher bei chronisch niereninsuffizienten Patienten mit entzündlicher Begleiterkrankung (Sjöholm et al. 1975, Kangas et al. 1976, Borga et al. 1977, Piafsky et al. 1978, Korber et al. 1979). Piafsky et al. (1978) führten die Bindungszunahme von Propranolol, wie bereits erwähnt, auf die bei Entzündungsprozessen erhöhte Plasmakonzentration des Bindungsproteins, das saure α_1 -Glykoprotein zurück. Von dieser Vorstellung ausgehend ist es durchaus verständlich, daß das vorwiegend an Albumin gebundene Diazepam unter diesen Umständen keine Bindungsänderung aufweist. Die Bindung von Propranolol an Plasma verhält sich beim Menschen und beim Kaninchen unter bestimmten Bedingungen recht ähnlich. So zeigen beide Spezies bei chronischer Niereninsuffizienz eine nahezu unveränderte Plasmabindung, während bei zusätzlicher entzündlicher Begleiterkrankung die Bindung sowohl beim Menschen als auch beim Tier signifikant erhöht ist. Offensichtlich lassen sich zumindest die durch die Niereninsuffizienz bzw. durch die entzündliche Begleiterkrankung verursachten qualitativen Bindungsveränderungen durch die Verwendung von Versuchstieren ziemlich gut vorhersagen.

Bemerkenswert ist auch die bei Tieren mit Entzündung erhöhte Bin-

dung von Propranolol und Imipramin in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den niereninsuffizienten Tieren. Da bei den scheinoperierten Tieren die Nierenfunktion nicht eingeschränkt ist, kommt es auch zu keiner Anhäufung von Stoffwechselprodukten im Plasma und folglich auch nicht zu vermehrter Verdrängung dieser Pharmaka aus ihrer Proteinbindung. Somit wirkt sich die erhöhte Plasmakonzentration des sauren α_1 -Glykoprotein in der Kontrollgruppe deutlicher aus als dies bei den niereninsuffizienten Tieren der Fall ist.

Wie der Vergleich der Plasmabindung bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz in Tab. 5 zeigt, fallen die Bindungsänderungen bei akuter Funktionseinschränkung sehr viel deutlicher aus. Bei chronischer Niereninsuffizienz zeigen die genannten Pharmaka bezüglich des Bindungsverhaltens die gleiche Tendenz, doch sind hier die Bindungsänderungen insgesamt nur sehr gering ausgeprägt. Dies beruht vermutlich auf dem nur mäßigen Ausprägungsgrad der Nierenfunktionseinschränkung. Die Dauer der Niereninsuffizienz, rund 240 Tage bei chronischem Verlauf gegenüber nur 6 Tagen bei akuter Niereninsuffizienz, scheint nur geringe Auswirkungen auf die Plasmabindung der untersuchten Pharmaka zu haben. Das bedeutet, daß die Bindungsänderungen im Plasma bei Niereninsuffizienz in erster Linie vom Ausprägungsgrad und nicht von der Dauer der Funktionseinschränkung der Niere abhängig sind.

	KO ^{a)}	akute NI ^{a)}	KO ^{b)}	chron. NI ^{b)}
	K: 90	K: 620	K: 80	K: 180
	H: 5,1	H: 92,0	H: 4,9	H: 9,7
	D: 6	D: 6	D: 240	D: 240
DIZ	93,3 ± 0,4	85,3 ± 0,6	91,8 ± 1,3	91,5 ± 0,6
PRO	64,0 ± 5,7	84,2 ± 9,1	58,4 ± 3,9	62,2 ± 2,1
IMI	82,1 ± 3,3	86,5 ± 4,3	77,8 ± 3,2	78,7 ± 1,8

Tab. 5: Vergleich der Bindung an Kaninchenplasma bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz

K = Kreatinin (µmol/l); H = Harnstoff (mmol/l);

DIZ = Diazepam; PRO = Propranolol; IMI = Imipramin;

KO = Kontrollgruppe; NI = niereninsuffiziente Gruppe;

D = Verlaufsduer (Tage);

a) Gerdsmeyer 1983 (pers. Mitteilung)

b) eigene Versuche (vgl. Abb. 4 und 5, Tab. 5)

4.2.2 Bindung an Gewebehomogenate

4.2.2.1 Bindung an Muskelhomogenat

Der Einfluß einer experimentell erzeugten akuten Niereninsuffizienz auf die Bindung von Pharmaka an Muskelgewebe wurde bereits von einigen Untersuchern beschrieben (Ali u. Lindup 1979, Fichtl u. Kurz 1980b, Van Peer et al. 1981b). In den Untersuchungen von Fichtl u. Kurz (1980b) war die Bindung von basischen Substanzen wie Chinidin und Propranolol an Muskelhomogenat nicht signifikant verändert.

Van Peer et al. (1981b) untersuchten u.a. die Bindung von Phenytoin an Muskelgewebsstücke, fanden aber ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe.

Auch in unseren Versuchen mit Muskelgewebe von chronisch niereninsuffizienten Tieren, konnten für die untersuchten Pharmaka keine größeren Bindungsänderungen festgestellt werden. Imipramin zeigte zwar in der Gruppe der nephrektomierten Kaninchen eine signifikante Bindungszunahme ($p < 0,01$), die mit rund 1,6 % jedoch nur sehr gering ausgeprägt war.

Ähnlich den Ergebnissen bei der Plasmaproteinbindung scheinen die Änderungen in der Muskelbindung vom Grad der Beeinträchtigung der Nierenfunktion abhängig zu sein, da deutliche Auswirkungen nur bei akuter Niereninsuffizienz beobachtet werden konnten (vgl. Tab. 6). Alles in allem scheint die Muskelbindung gegenüber dem Einfluß der Niereninsuffizienz weniger empfindlich zu sein als die Plasmabindung. Es bleibt zu untersuchen, ob eine ausgeprägtere chronische Niereninsuffizienz die Muskelbindung stärker beeinträchtigt.

	KO ^{a)}	akute NI ^{c)}	KO ^{b)}	chron. NI ^{b)}
	K: 90	K: 620	K: 80	K: 180
	H: 5,1	H: 92,0	H: 4,9	H: 9,7
	D: 6	D: 6	D: 240	D: 240
DIZ	87,5 $\pm$ 0,9	86,4 $\pm$ 2,0	89,1 $\pm$ 1,1	88,4 $\pm$ 1,5
PRO	82,4 $\pm$ 1,8	82,2 $\pm$ 1,7	81,5 $\pm$ 0,8	81,9 $\pm$ 1,4
IMI	88,6 $\pm$ 1,0	88,5 $\pm$ 0,7	89,5 $\pm$ 1,1	91,1 $\pm$ 1,2

Tab. 6: Vergleich der Bindung an Kaninchenmuskelhomogenat bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz

K = Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$); H = Harnstoff (mmol/l);

DIZ = Diazepam; PRO = Propranolol; IMI = Imipramin;

KO = Kontrollgruppe; NI = niereninsuffiziente Gruppe;

D = Verlaufsduer (Tage);

b) eigene Versuche (vgl. Abb. 4 u. 5, Tab. 6)

c) Gerdsmeyer 1983 (pers. Mitteilung): DIZ und IMI

Fichtl und Kurz 1980b: PRO

4.2.2.2 Bindung an Leberhomogenat

Inwieweit eine experimentell erzeugte akute Niereninsuffizienz die Bindung von Pharmaka an Lebergewebe beeinflusst, wurde von Fichtl u. Kurz (1980b) und von Van Peer et al. (1981b) untersucht. Sie berichten übereinstimmend über die nahezu unveränderte Bindung von sauren und basischen Substanzen an Lebergewebe. Eine Ausnahme war Phenylbutazon, für das Van Peer et al. (1981b) eine Bindungserhöhung im Lebergewebe von urämischen Kaninchen fand.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bindungsversuche an Leberhomogenat erbrachten für Propranolol und Imipramin keine signifikanten Unterschiede zwischen der niereninsuffizienten und der Kontrollgruppe. Bei Diazepam wurde zwar eine signifikante Bindungsabnahme ($p < 0,01$) beobachtet, da sie aber mit 1,1 % gemessen an der Gesamtbindung nur gering war, kann ihr keine größere Bedeutung beigemessen werden.

4.2.2.3 Bindung an Lungenhomogenat

Über den Einfluß von experimentell erzeugter akuter Niereninsuffizienz auf die Bindung von Pharmaka an Lungengewebe berichten Van Peer et al. (1981b). Sie fanden keine signifikanten Bindungsänderungen gegenüber der Kontrollgruppe für Phenylbutazon, Phenytoin und Antipyrin.

Auch in unseren Versuchen mit chronisch niereninsuffizienten Kaninchen, konnten wir keine signifikanten Bindungsänderungen feststellen. Die Bindungswerte der Kontrollgruppe lagen für Propranolol und Imipramin bei 94 % bzw. 97 %, für Diazepam bei etwa 90 %. In

der Literatur sind Werte für Propranolol und Imipramin (in Ratten- bzw. Kaninchenlungen) in der Größerordnung 92 - 95 % bzw. 94 - 98 % angegeben (Junod 1972, Dollery u. Junod 1976, Street et al. 1978).

4.2.2.4 Bindung an Nierenhomogenat

In Bindungsversuchen mit Nierenhomogenat von akut niereninsuffizienten Kaninchen, fanden wiederum Van Peer et al. (1981b) und Fichtl u. Kurz (1980b) signifikante Bindungsänderungen für verschiedene Substanzen. Chlorpromazin, Phenytoin und Warfarin wurden vermindert, Phenylbutazon hingegen vermehrt gebunden. Da die Niere aber nur etwa 0,4 % der Gesamtkörpermasse repräsentiert, sollte diesen Ergebnissen in Bezug auf die Pharmakokinetik keine größere Bedeutung beigemessen werden.

In unseren Versuchen mit chronisch niereninsuffizienten Kaninchen konnten wir nur geringe, nicht signifikante Bindungsänderungen im Vergleich zu den kontrollloperierten Tieren feststellen. Die Werte für die untersuchten Pharmaka lagen bei etwa 95 %, wobei sich wiederum das hohe Ausmaß der Gewebefindung von basischen Pharmaka zeigte.

4.2.3 Vergleich der Plasma- und Gewebefindung

Wie aus Abb. 11 zu ersehen ist, ergibt sich für die 3 basischen Pharmaka, Diazepam, Propranolol und Imipramin, bezüglich des Bindungsausmaßes an Gewebefindogenate, die gleiche Reihenfolge:

Leber > Niere > Lunge > Muskel

Innerhalb der verschiedenen untersuchten Gewebe, war in der Kontrollgruppe die Pharmakonbindung an Leberhomogenat am höchsten,

welches sich in Abb. 11 im niedrigsten freien Anteil ausdrückt. Es folgen mit jeweils etwas niedrigeren Bindungswerten Niere, Lunge und Muskel. In der Gruppe der niereninsuffizienten Tiere waren keine Änderungen in der Bindungsreihenfolge der Substanzen festzustellen (Abb. 11). Die Plasmabindung der 3 untersuchten Substanzen weist eine andere Rangfolge aus. Für Imipramin und insbesondere für Propranolol war die Plasmabindung deutlich geringer als die Gewebefindung, während die Werte für Diazepam im Plasma und Gewebe auf nahezu gleichen Niveau (90 - 97 %) lagen.

Dies ist vermutlich durch die unterschiedliche Konzentration der verschiedenen Bindungsproteine im Plasma bedingt (vgl. Kap. 4.2.1). In Abb. 12 ist der Quotient aus gebundenem und freiem Anteil (B/F) der Plasma- und Gewebefindung gegen den Plasmakreatininwert der chronisch niereninsuffizienten Tiere aufgetragen. Dabei zeigte Diazepam eine mit steigenden Plasmakreatininwerten abnehmende, Propranolol und Imipramin hingegen zunehmende Bindungstendenz.

Das beobachtete unterschiedliche Bindungsverhalten von Diazepam bzw. Propranolol und Imipramin bei zunehmender Niereninsuffizienz ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Beeinflussbarkeit der verschiedenen Bindungsmechanismen zurückzuführen.

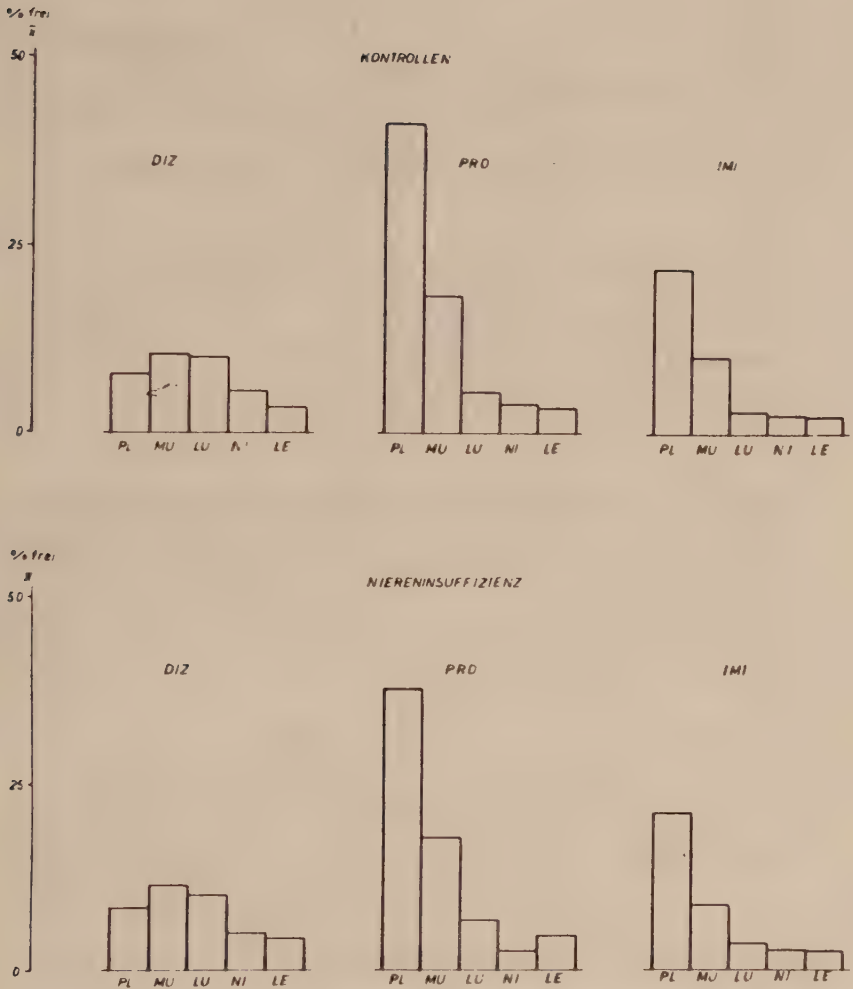


Abb. 11: Vergleich der Pharmakonbindung an Plasma und Gewebekomponenten von scheinoperierten und chronisch niereninsuffizienten Kaninchen, dargestellt durch den freien Anteil.

DIZ = Diazepam; PRO = Propranolol; IMI = Imipramin

PL = Plasma; MU = Muskel; LU = Lunge; NI = Niere

LE = Leber;

$\bar{x}$ = Mittelwert

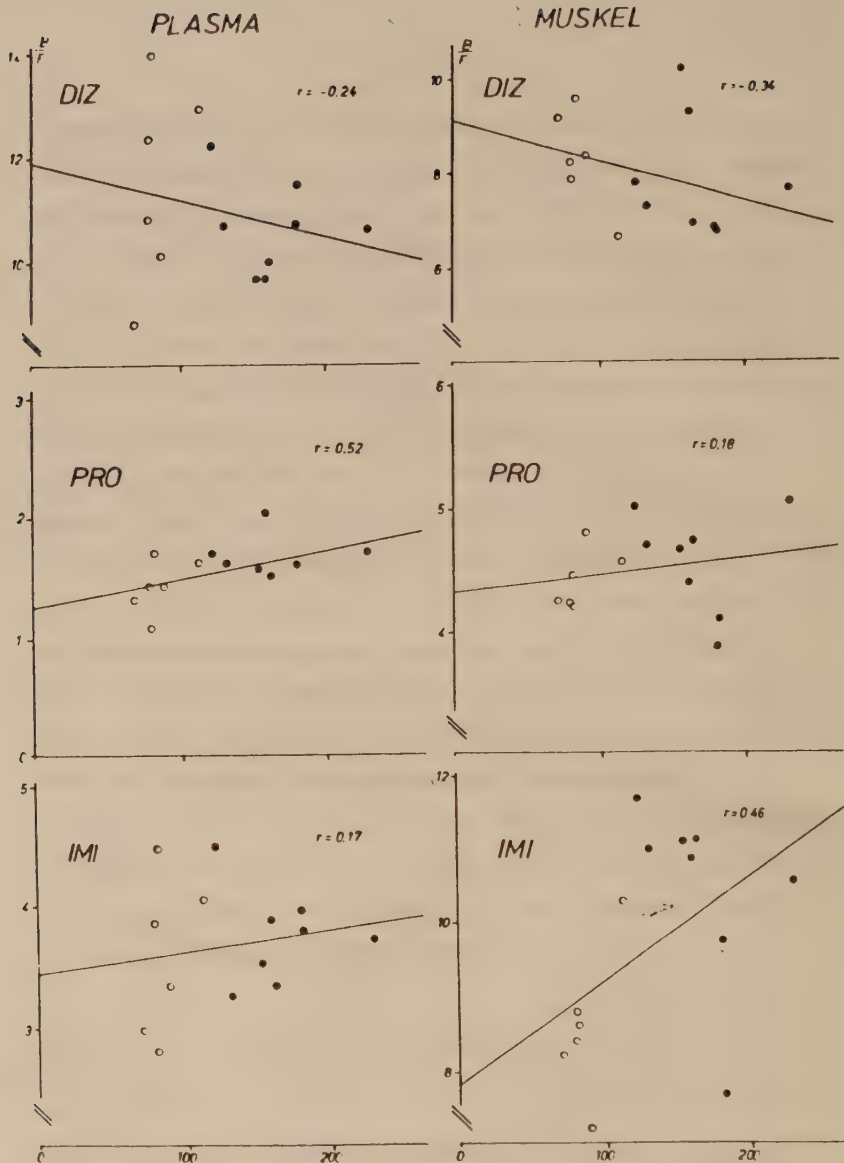


Abb. 12: Zusammenhang von Plasma- und Muskelbindung (B/F , Ordinaten) und dem Kreatininwert ($\mu\text{mol/l}$, Abszissen) der 5/6 nephrektomierten Tiere.

DIZ = Diazepam; PRO = Propranolol; IMI = Imipramin

Bedeutung der Symbole: o = scheinoperierte Tiere

• = 5/6 nephrektom. Tiere

5. Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß einer experimentell am Kaninchen erzeugten chronischen Niereninsuffizienz auf die Plasma- und Gewebebindung von 3 basischen Pharmaka: Diazepam, Propranolol und Imipramin untersucht.

Die chronische Niereninsuffizienz entwickelte sich im Anschluß an eine 5/6 Nephrektomie im Verlauf von rund 240 Tagen. In der nephrektomierten Gruppe lag die Plasmakonzentration von Kreatinin bei $180 \mu\text{mol/l}$, von Harnstoff bei $9,7 \text{ mmol/l}$, in der Kontrollgruppe bei $80 \mu\text{mol/l}$ bzw. $4,9 \text{ mmol/l}$.

Die 5/6 Nephrektomie ist eine gut geeignete Methode zur experimentellen Erzeugung einer chronischen Niereninsuffizienz, weil sich das Ausmaß der Insuffizienz durch die Menge der Gewebeentnahme steuern läßt. Nachteil dieser Methode ist der hohe zeitliche und materielle Aufwand, sowie der nur mäßige Ausprägungsgrad der Niereninsuffizienz.

Die Bindungsversuche wurden rund 240 Tage nach der 5/6 Nephrektomie bzw. Scheinoperation durchgeführt. Die in vitro Arzneimittelbindung an Plasma und Muskel-, Leber-, Lungen- und Nierenhomogenat wurde mittels Dialyse bzw. Ultrafiltration bestimmt.

Die Bindung der 3 basischen Pharmaka an Plasma war bei den niereninsuffizienten Kaninchen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert.

Bei 3 von 11 Tieren aus der 5/6 nephrektomierten und bei 2 von 8 Tieren aus der scheinoperierten Gruppe wurde während der 240 tägigen

Beobachtungsdauer eine entzündliche Begleiterkrankung festgestellt. Diese Tiere zeigten gegenüber den nicht erkrankten Kaninchen eine deutliche Zunahme der Plasmabindung von Propranolol und Imipramin.

Die Bindung von Propranolol und Diazepam an Muskelhomogenat war nicht verändert. Imipramin zeigte eine signifikante Zunahme der Bindung um rund 1,6 %.

Das Ausmaß der Bindung an Leberhomogenat war - bis auf eine geringfügige, signifikante Bindungsabnahme für Diazepam (1,1 %) - unverändert. Auch die Bindung der Pharmaka an Lungen- und Nierenhomogenat wurde durch die chronische Niereninsuffizienz nicht signifikant beeinflusst.

Die Ergebnisse legen nahe, daß die Veränderungen der Pharmakonbindung durch Niereninsuffizienz vorwiegend vom Grad der Funktionseinschränkung abhängig sind. Über längere Zeit bestehende, kompensierte, chronische Niereninsuffizienz zeigte nur geringe Auswirkungen auf die Plasma- bzw. Gewebefindung der basischen Pharmaka.

6. Literaturverzeichnis

Ali, M., Lindup, W.E.

Disposition and pharmacokinetics of phenytoin in rats
with acute renal failure

Brit. J. Pharmacol. 66, 487P, 1979

Belpaire, F., Bogaert, M., De Bros, M., Mussche, M.

Serum binding of quinidine in experimental acute
renal failure

Pharmacology 15, 311 - 317, 1977

Borga, O., Piafsky, K.M., Nilsen, O.G.

Plasma protein binding of basic drugs

Clin. Pharmacol. Ther. 22, 539 - 544, 1977

Craig, L.C., Ansevin, A.

Dialysis studies VI: Experiments with amino acids

Biochemistry 2, 1268 - 1271, 1963

Craig, L.C., King, T.P.

Dialysis in: Methods of biochemical analysis

Voix ed.: D. Glick

Interscience Publ. New York, London, Sydney, 1966

Dollery, C.T., Junod, A.F.

Concentration of ($\pm$) - propranolol in isolated,
perfused lungs of rats

Brit. J. Pharmacol. 57, 67 - 71, 1976

Donadio, I.V., Farmer, C.D., Hunt, I.C., Tauxe, W.N.
Hallenbeck, G.A., Short, G.A.

Renal function in donors and recipients of renal
transplantation Radioisotopic measurements

Ann. Intern. Med. 66, 105 - 115, 1967

Fichtl, B., Kurz, H.

Does determination of drug binding in homogenized
tissue reflect binding in the intact organ?

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311, suppl. R3, 1980a

Fichtl, B., Kurz, H.

Influence of acute experimental renal failure on plasma
and tissue binding of drugs

Abstract 605, World Conference of Clinical Pharmacology
and Therapeutics, Macmillan, London 1980b

Fremstad, D., Bergerud, K., Haffner, J.F.W., Lunde, P.K.M.

Increased plasma binding of quinidine after surgery

Europ. J. clin. Pharmacol. 10, 441 - 444, 1976

Giacomini, K.M., Roberts, S.M., Levy, G.

Evaluation of methods for producing renal dysfunction
in rats

J. Pharm. Sci. 70, 117 - 121, 1981

Hayslett, J.P.

Functional adaption to reduction in renal mass

Physiol. Rev. 59, No 1, 137 - 164, 1979

Herzfeldt, C.D.

Dissoziationskonstanten von Arzneistoffen. Eine Übersichtstabelle

Pharmazeut. Ztg. 125, 608 - 614, 1980

Höllt, V., Teschemacher, H.

Hydrophobic interactions responsible for unspecific binding of morphine-like drugs

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288, 163 - 177, 1975

Junod, A.F.

Accumulation of 14 C-imipramine in isolated perfused rats lungs

J. Pharmacol. Exp. Ther. 183, 182 - 187, 1972

Kangas, L., Kanto, J., Forsström, J., Jisalo, E.

The protein binding of diazepam and N-demethyldiazepam in patients with poor renal function

Clin. Nephrol. 5, 114 - 118, 1976

Katz, A.J., Epstein, F.H.

Relation of glomerular filtration rate and sodium reabsorption to kidney size in compensatory renal hypertrophy

Yale J. Biol. Med. 40, 222 - 230, 1967

Kaufman, J.M., Di Meola, H.J., Siegel, N.J., Lytton, B.,

Kashgarian, M., Hayslett, J.P.

Compensatory adaption of structure and function following progressive renal ablation

Kidney Int. 6, 10 - 17, 1974

Kober, A., Sjöholm, J., Borga, O., Odar-Cederlöf, I.

Protein binding of diazepam and digitoxin in uremic and normal serum

Biochemical Pharmacology 28, 1037 - 1042, 1979

Kurz, H., Trunk, H., Weitz, B.

Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs

Arzneimittel-Forschung 27, 1373 - 1380, 1977

Kurz, H., Fichtl, B.

Relevance of drug binding to animal muscle tissue for human muscle binding

Symposium on drug protein binding, Stockholm 1980

Acta pharm. suec. 17, No 2, 1980

Lin, J.H., Sugiyama, Y., Awazu, S., Hanano, M.

In vitro and in vivo evaluation of the tissue-to-blood partition coefficient for physiological pharmacokinetic models

J. Pharmacokin. Biopharm. 10, 637 - 647, 1982a

Lin, J.H., Sugiyama, Y., Awazu, S., Hanano, M.

Physiological pharmacokinetics of ethoxybenzamide based on biochemical data obtained in vitro as well on physiological data

J. Pharmacokin. Biopharm. 10, 649 - 661, 1982b

von Nieciecki, A.

Bindung von Pharmaka an isoliertes Myosin von
Kaninchenskelettmuskeln

Dissertation, Universität München, 1983

Ormrod, D., Miller, T.

Experimental uremia. Description of a model producing
varying degrees of stable uremia

Nephron 26, 249 - 254, 1980

Pabico, R.C., Mc Kenna, B.A., Freeman, R.B.

Renal function before and after unilateral nephrectomy
in renal donors

Kidney Int. 8, 166 - 175, 1975

van Peer, A., Belpaire, F.M., Bogaert, M.G.

Binding of drugs in serum, blood cells and tissue
of rabbits with experimental acute renal failure

Pharmacology 22, 146 - 152, 1981b

Piafsky, K.M., Borga, O., Odar-Cederlöf, J.

Johannson, C., Sjöqvist, F.

Increased plasma protein binding of propranolol and
chlorpromazine mediated by disease-induced elevations
of plasma α_1 -acid glycoprotein

New Engl. J. Med. 299, 1435 - 1439, 1978

Piafsky, K.M.

Disease-induced changes in the plasma binding of basic drugs
Clinical Pharmacokinetics 5, 246 - 262, 1980

Rous, S.M., Wakin, K.G.

Kidney function before, during and after compensatory
hypertrophy

J. Urol. 98, 30 - 35, 1967

Sachs, L.

Angewandte Statistik, 5. Auflage

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1978

Sager, G., Nilsen, O.G., Jacobsen, S.

Variable binding of propranolol in human serum

Biochemical Pharmacology 28, 905 - 911, 1979

Schanker, L.S., Morrison, A.S.

Physiological disposition of guanethidine in the rat
and its uptake by heart slices

J. Neuropharmacol. 4, 27 - 39, 1965

Schuhmann, G.

Beziehung zwischen der Bindung von Pharmaka an Plasma
und Gewebe in vitro und ihrer Verteilung in vivo

Dissertation, Universität München, 1985

Sjöholm, I., Kober, A., Odar-Cederlöf, I., Borga, O.

Proteinbinding of drugs in uremic and normal serum: The
role of endogenous binding inhibitors

Biochem. Pharmacol. 25, 1205 - 1213, 1975

Street, J.A., Gonda, J., Parkinson, H., Hemsworth, B.A.

Lung accumulation of some β -adrenoceptor antagonists

J. Pharm. Pharmacol. 30, 56P, 1978

Taylor, J.D., Richards, R.K., Davin, J.C., Asher, J.

Plasma binding of thiopental in the nephrectomized rabbit

J. Pharm. 112, 40 - 48, 1954

Threlfall, G., Taylor, D.M., Buck, A.T.

Studies of the changes in growth and DNA synthesis
in the rat kidney during experimentally induced renal
hypertrophy

Am. J. Pathol. 50, 1 - 14, 1967

Toback, F.G., Lowenstein, L.M.

Thymidine metabolism during normal and compensatory
renal growth

Growth 38, 35 - 44, 1974

Lebenslauf

Am 28. August 1955 wurde ich als Sohn des Bäckermeisters Wilhelm Nothofer und seiner Ehefrau Theresia, geb. Knott in Klimmach, Kreis Augsburg geboren.

Die Kindheit verbrachte ich an meinem Geburtsort. Von September 1961 bis Juli 1965 Besuch der Volksschule Klimmach. Danach trat ich in den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums am Maristenkolleg in Mindelheim über. Abitur am 22. Juni 1974. Anschließend leistete ich auf dem Fliegerhorst Landsberg den Grundwehrdienst ab. Im Oktober 1975 begann ich eine Lehre als Zahntechniker, welche ich am 08. Februar 1979 mit der Gesellenprüfung abschloß.

Im Sommersemester 1979 Aufnahme des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Im Rahmen der praktischen Ausbildung war ich an den chirurgischen und inneren Abteilungen des Zentralklinikums Augsburg, sowie an der Kinderklinik in Augsburg tätig. Medizinisches Staatsexamen am 25. April 1985.

Seit 18. Juni dieses Jahres bin ich als chirurgischer Assistenzarzt im Krankenhaus Schwabmünchen tätig.

Ich bin seit Oktober 1980 verheiratet. Wir haben drei Kinder.

